

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-201383

(43)公開日 平成8年(1996)8月9日

(51)Int.Cl.⁶

G 0 1 N 33/53

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

V

S

審査請求 未請求 請求項の数2 FD (全9頁)

(21)出願番号 特願平7-25893

(22)出願日 平成7年(1995)1月20日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年7月25日
社団法人日本化学会発行の「生化学V o 1. 66 N
o. 7」に発表

(71)出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(71)出願人 591030628

松本 黙武

千葉県浦安市美浜4-3-13

(72)発明者 福井 恵美子

東京都中野区大和町一丁目21番11号

(72)発明者 水谷 幸子

埼玉県所沢市下富1043-60

(72)発明者 小島 京子

東京都足立区千住二丁目1番1号1006

(74)代理人 弁理士 内田 幸男

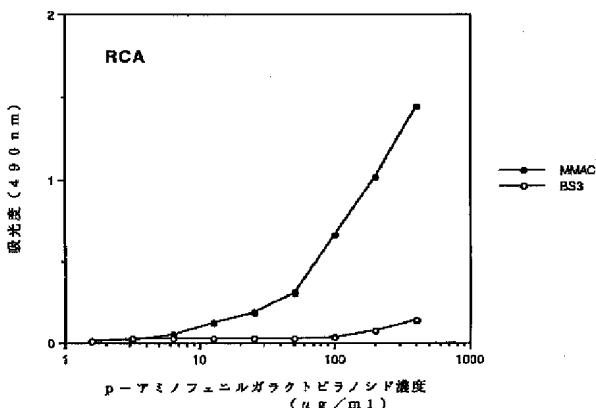
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 糖鎖構造を決定する方法

(57)【要約】

【構成】 (1)複合糖質由來の糖鎖または糖ペプチドと、これらの分子末端基と反応して共有結合を形成し得る反応基を有するポリマーでコーティングした固相とを反応させ、(2-1)得られる固定化糖鎖または固定化糖ペプチドと、これらと特異的に結合する標識化された物質とを反応させ、または(2-2)該固定化糖鎖または固定化糖ペプチドと、これらと特異的に結合する結合用物質とを反応させ、さらに、得られる生成物と、該結合用物質と特異的に結合する標識物質とを反応させ、次いで、(3)生成する標識化固相を検出することからなる糖鎖構造を決定する方法。

【効果】 簡便に且つ効率よく糖鎖構造を決定できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 複合糖質由來の糖鎖または糖ペプチドと、該糖鎖または該糖ペプチドの分子末端基と反応して共有結合を形成し得る反応基を有するポリマーでコーティングした固相とを反応させて固定化糖鎖または固定化糖ペプチドを生成し、

(2) 該固定化糖鎖または固定化糖ペプチドと、これらと特異的に結合する標識化された物質とを反応させ、

(3) 生成する標識化された固相を検出することを特徴とする糖鎖構造を決定する方法。

【請求項2】 (1) 複合糖質由來の糖鎖または糖ペプチドと、該糖鎖または該糖ペプチドの分子末端基と反応して共有結合を形成し得る反応基を有するポリマーでコーティングした固相とを反応させて固定化糖鎖または固定化糖ペプチドを生成し、

(2) 該固定化糖鎖または固定化糖ペプチドと、これらと特異的に結合する結合用物質とを反応させ、

(3) 得られる生成物と、該結合用物質と特異的に結合する標識物質とを反応させ、

(4) 生成する標識化された固相を検出することを特徴とする糖鎖構造を決定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、糖鎖構造を決定する方法に関し、さらに詳しくは、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどの複合糖質の糖鎖構造を簡便に効率よく決定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 自然界に広く分布している複合糖質の糖鎖は生体内の重要な構成成分であり、細胞間の相互作用に深く関わっていることが明らかにされつつある。それにともない様々な糖鎖構造の微量解析の技術が開発されており、これらの技術は、糖鎖の切り出し、糖鎖の分離精製、糖鎖の標識などの工程を適宜組み合わせたものであるが、最終的には、得られた糖に関する確実な情報を得るためににはNMRやMSによる同定が必要であり、非常に煩雑な手間を要する。これらの手間を省いて簡便に糖鎖構造を決定できる方法も提案されている。

【0003】これまで提案されている簡便な糖鎖構造解析方法は、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の手法を応用したものとしては、糖識別能を有するレクチンを固定化したカラムを利用する分析方法(Anal. Biochem., 164, 374(1987)ハラダら)、2種類のモードのHPLCを組み合わせた二次元HPLC(Anal. Biochem., 171, 73(1988)トミヤら)による方法、および、試料を予めエキソグリコシダーゼなどの混合酵素系列で処理し、処理した試料をHPLCで分析することにより糖鎖構造を決定する方法(化学と生物 32(10)661(1994)コニシら)などを挙げることができる。これらは、いずれも、HPLCのクロマトグラムの保持時間を

指標に糖鎖構造を決定する方法である。

【0004】しかしながら、HPLCの手法を利用した分析方法は、(1)一回に一試料の解析しかできず、多数の試料を同時に解析することはできない、(2) HPLCの条件設定が微妙で保持時間がずれ、不正確になる可能性が高い、(3) HPLCをポストカラムリアクターまたはプレカラムリアクターと組み合わせたものは試薬を大量に消費する、(4) レクチン固定化カラムを用いると、レクチンの糖に対する親和性の変化のため吸着する糖ペプチドにも影響が生じる可能性がある、などの問題点を抱えている。

【0005】また、固相に糖鎖を固定化して解析する方法も試みられているが、親水性の高い糖鎖を固定化するのは技術的に困難を伴う。そのため、糖鎖を固定化するための技法が提案されている。例えば、アミノプレートに糖鎖の還元末端を利用して酸アミド結合により固定化する方法(Anal. Biochem., 182, 200(1989)オオバヤシら)、糖鎖自体に疎水性を付与する目的で高分子化してプレートに吸着せしめる方法(特開昭62-212568)、糖鎖をビオチニル化し、アビジンを結合させた固相に、アビジンとビオチンの強力な親和性を利用して糖鎖を固定化する方法などが挙げられる。しかしながら、プレートなどの固相に固定化する方法においては、糖鎖の前処理および縮合剤を用いた固相化に伴う固定化率の低下、操作の煩雑さ、長時間を要する、また生体成分を共存させることによる非特異的吸着などが生じ易い、などの問題点があった。また、最近、表面プラズモン共鳴を利用した分析手法によって糖鎖を分析することも提案されているが、高価な特殊な機器を用いるため汎用性に富む方法ではない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、複合糖質に由来する糖鎖または糖ペプチドを一段階で効率的に固相に固定化し、さらにその上に標識物質を固定化して、得られる標識化された固相を検出することによって、簡便に効率よく糖鎖構造を決定することができる方法を提供することにある。本発明の方法によれば、分析に所要な一連の反応を従来の検出機器を用いて効率よく行うことができ、また、多数の微量試料を一度に分析することができる。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、(1) 複合糖質由來の糖鎖または糖ペプチドと、該糖鎖または該糖ペプチドの分子末端基と反応して共有結合を形成し得る反応基を有するポリマーでコーティングした固相とを反応させて固定化糖鎖または固定化糖ペプチドを生成し、(2) 該固定化糖鎖または固定化糖ペプチドと、これらと特異的に結合する標識化された物質とを反応させ、(3) 生成する標識化された固相を検出することを特徴とする糖鎖構造を決定する方法が提供される。

【0008】さらに本発明によれば、(1)複合糖質由來の糖鎖または糖ペプチドと、該糖鎖または該糖ペプチドの分子末端基と反応して共有結合を形成し得る反応基を有するポリマーでコーティングした固相とを反応させて固定化糖鎖または固定化糖ペプチドを生成し、

(2)該固定化糖鎖または固定化糖ペプチドと、これらと特異的に結合する結合用物質とを反応させ、(3)得られる生成物と、該結合用物質と特異的に結合する標識物質とを反応させ、(4)生成する標識化された固相を検出することを特徴とする糖鎖構造を決定する方法が提供される。

【0009】以下、本発明の糖鎖構造を決定する方法を詳細に説明する。本発明の測定対象は、複合糖質、すなわち、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどの非糖質成分を含む糖質の糖鎖構造であって、糖質自体は単糖、オリゴ糖および多糖のいずれでもよく格別限定されるものではない。

【0010】用いる検体は格別限定されるものではなく、検体に含まれる糖鎖としては、各種のもの、例えば、N-グリコシド型、O-グリコシド型、コラーゲン型糖タンパク質およびガングリオ系、グロボ系、ラクト系糖脂質などの糖鎖が挙げられる。糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどの複合糖質から糖鎖を分離する方法としては、常用される方法、例えば、ヒドラジン分解法、プロナーゼによる徹底消化、N-グリカナーゼ処理、O-グリカナーゼ処理、トリフルオロ酢酸による分解法などを挙げることができ、それらによる処理操作などは、通常のこの種の方法で採られているものと同様に行ない得る。(Methods Enzymol., Vol 83, 263(1982))

【0011】本発明の方法においては、先ず、複合糖質由來の糖鎖または糖ペプチドを固定化した固相を調製する。そのためには、先ず、細胞またはそれに由來する生物標品より単離した糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどの複合糖質を酵素などによる消化を行って糖鎖または糖ペプチドのフラグメントを得る。各フラグメントはHPLCなどによって分離精製し、各ピークフラクションを適量取り、固定化用の糖鎖または糖ペプチドのフラグメントを得る。糖鎖の分画には様々なクロマトグラフィーを用いることが出来るが、特に糖ペプチドのような低分子物質の分離にはC18等による逆相HPLCが適している。溶出画分モニターには210-230nmの吸収を検出するのが簡便でよい。得られたフラクションはピーク毎に分取乾燥し、固定化用固相との反応に用いる。

【0012】糖鎖または糖ペプチドのフラグメントを固定すべき固相は格別限定されるものではなく、その材質としては、ポリオレフィン、ポリスチレン、置換ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデンなどのフッ素化ポリマー、ポリスルホン、ポリエ

ステル、ポリカーボネート、ポリアクリロニトリル、ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタンおよびこれらの共重合体などの水に難溶性または不溶性の合成重合体、セルロース類、ガラスなどが挙げられる。固相の形態も格別限定されるものではなく、代表的形態としてはマイクロプレート、膜、繊維、紙などが挙げられ、特にマイクロタイタープレートが最も好ましい。また、その大きさおよび厚さも格別限定されない。

10 【0013】糖鎖または糖ペプチドの固相上に固定化するに際しては、結合力を高めるために、予め、固相表面を、糖鎖または糖ペプチドの分子末端基、すなわち、糖鎖の還元末端のホルミル基または糖ペプチドの分子末端のアミノ基またはカルボキシル基と反応して共有結合(例えば酸アミド結合)を形成し得る反応基を有するポリマーでコーティングする。そのような共有結合を形成し得る反応基としては、例えば、エポキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、ヒドラジノ基、カルボキシル基、酸無水物基、ホルミル基などが挙げられる。

20 【0014】上記のような反応基を有するポリマーは、上記のような反応基を有する単量体の重合および他の反応基を有するポリマーの化学的変性などによって調製される。好ましいポリマーとしては、無水マレイン酸のような酸無水物モノマーの重合体、またはそれと共に重合し得るビニルモノマー、例えば、メチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル、イソブチルビニルエーテル、スチレンなどとの無水マレイン酸共重合体を例示することができる。さらに、エポキシ基を有するモノマーであるグリジルメタクリレート、グリジルアクリレート、またはカルボキシル基を有するモノマーであるアクリル酸、メタクリル酸などの重合体および共重合体を挙げることができる。得られた重合体の官能基をさらに化学変性して異なる官能基を有する重合体を得ることも可能であり、例えばエポキシ基または酸無水物を有する重合体は、アンモニア、ヒドラジンまたはプロパンジアミンのようなジアミノアルカン類、塩基性アミノ酸、ポリアミン類などと反応させることによりアミノ基を有する重合体を得ることができる。また、アミノ基を有する重合体は無水コハク酸のような酸無水物などと反応させることによりカルボキシル基を有する重合体とすることができる。水酸基を有する重合体の場合には、例えばアルカリ条件下で、1,4-ブタンジオールジグリシルエーテルのようなジグリシルエーテル類、1,7-オクタジエンジエポキシドのようなジエポキシド類などと反応させ、エポキシ基を有する重合体とすることができる。

30 【0015】これら被覆用のポリマーの分子量は、特に制限されることはないが、固相表面にコートするに適した疎水性、および粘性を有するためには、分子量は400以上であれば良く、特に2万以上100万以下が望ま

40

しい。上記反応基を有するポリマーを固相にコートする方法は格別限定されるものではなく、ポリマーの有機溶剤溶解液を浸漬法、塗布法その他のコーティング法を探ることができる。

【0016】糖鎖または糖ペプチドのフラクションと固定化固相との反応条件は特に制限されることはなく、通常この種の検出法の場合と同様でよい。すなわち、一般に45℃以下、好ましくは約4～40℃の温度条件下、1～40時間程度を要して反応を行なう。その際、反応媒体としては、反応に悪影響を与えない通常の溶媒、例えば、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、酢酸緩衝液などのpH4～8程度の緩衝液を好ましいものとして使用できる。

【0017】本発明の方法においては、上記のように糖鎖または糖ペプチドの固相上に固定化した後、(1)該糖鎖または糖ペプチドと、これらと特異的に結合する標識化された物質とを反応させて結合したうえ、生成する標識化された固相を検出するか、または(2)該糖鎖または糖ペプチドと、これらと特異的に結合する結合用物質を反応させ、さらに、該結合用物質と特異的に結合する標識物質とを反応させて結合したうえ、生成する標識化された固相を検出する。

【0018】上記(1)の方法において、固定化された糖鎖または糖ペプチドと特異的に結合する標識化された物質としては、標識レクチンおよび標識抗体としては、それぞれ、各種のレクチンおよび抗体を、通常の放射性物質、酵素標識物質、蛍光物質などの各種標識剤で標識化したものが用いられる。標識剤としての放射性物質としては、¹²⁵Iその他の放射性ヨード剤などを、蛍光物質としては、フルオレセイン・イソチオシアナート(FITC)、テトラメチルローダミン・イソチオシアナート(TRITC)、置換ローダミン・イソチオシアナート(XRITC)、ローダミンB・イソチオシアナート、ジクロロトリアジンフルオレセイン(DTAF)などを、また、酵素標識物質としては、ペーオキシダーゼ、マイクロペーオキシダーゼ、キモトリプシノーゲン、プロカルボキシペプチダーゼ、グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、アミラーゼ、ホスホリラーゼ、DNA-ナーゼ、β-ガラクトシダーゼなどをそれぞれ挙げることができる。

【0019】標識化すべきレクチンとしては公知の各種のもの、例えば、ConA、RCA60、RCA120、LCA、PSA、VFA、L-PHA、E-PHA、WGA、PNAなどを例示できる。上記各種レクチンは市販品として入手することもでき、また常法に従って製造することもできる(J. Biol. Chem., 254, 9349-9351(1979); Nature, 194, 495(1962)); 蛍光抗体法、医化学実験講座4, 263-270; Acta. Endocrinol. Suppl., 168, 206(1972)など参照)。また、標識化すべき抗体に

ついても特に制限はなく、糖鎖または糖ペプチドを特異的に認識する抗体であれば良い。抗体を適切に選ぶことによって、固定化された糖質または糖ペプチドに対する特異性および親和力の高い標識化抗体が得られる。

【0020】上記(2)の方法において、固定化された糖鎖または糖ペプチドと特異的に結合する結合用物質としては、標識化されていないレクチンおよび抗体が好ましく用いられる。レクチンおよび抗体としては、上記(1)の方法において用いられる標識化すべきレクチンおよび抗体と同様に、糖鎖または糖ペプチドを特異的に認識するものであれば格別限定されることなく、各種レクチンおよび抗体の中から選ぶことができる。

【0021】上記(2)の方法においては、標識化されていない結合用物質を結合せしめた後、該結合用物質と特異的に結合する標識物質を反応させて結合する。ここで標識物質としては、レクチンまたは抗体に対して親和性をもつ標識化抗体、あるいはレクチンに対して親和性をもつ糖を有する赤血球およびポリマーラテックスなどの物質が挙げられる。

【0022】上記(1)および(2)の方法は、両者を比較すると一長一短があるが、次の点では上記(2)の方法が優れている。すなわち、上記(1)の方法では、一般に、使用できる標識化レクチンまたは標識化抗体が限定され、入手困難であり、また標識化レクチンまたは標識化抗体の調製を試みた場合には、得られた標品の精製などに手間がかかることに加えて、レクチンや抗体の特異性および親和力が変わるという変性を惹き起こす可能性がある。これとは対照的に、上記(2)の方法では、結合用物質を介在させることによって広範囲に亘る標識化抗体が利用でき、それらの難点がない。

【0023】上記(1)の方法における標識レクチンまたは標識抗体の結合反応、ならびに、上記(2)の方法における標識化されていない結合用物質の結合反応および標識物質の結合反応は、いずれも、前記糖鎖または糖ペプチドの固定化の場合と同様に、通常のこの種の反応と同様にして実施できる。その際、反応に悪影響を与えない前記した各種溶媒を使用することができ、また、所望により反応系にカルシウムやマンガンなどの金属イオンを加えることもできる。上記反応は一般に45℃以下、好ましくは約4～40℃の温度条件下、1～40時間程度を要して行なわれる。

【0024】上記(1)および(2)両方法において、最終的に得られた固定化標識物質を検出するには、固相の形状、光学的性質に応じて、吸光スペクトル変化の測定、あるいは放射活性の測定などによって適宜行われる。例えば、固相がマイクロプレートである場合には、一般的な酵素免疫法(ELISA)に用いられるプレートリーダーなどで簡便に検出することができる。

【0025】

【実施例】以下に本発明の実施例を示し本発明を具体的

に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

MMA C (メチル・ビニル・エーテル/無水マレイン酸共重合体、/n-263, 分子量41000) を 5 mg/m1 の濃度でヘキサンに溶かし、この溶液を 96 穴のマイクロタイタープレート (Immulon 200, C. A. Greiner and Sohn e, GmbH & CoKG, Germany) の各ウェルに 100 μ l ずつ加えて、室温で 30 分間静置した。上清を捨てた後、50 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH7.0) に溶かした p-アミノフェニルガラクトピラノシド (糖ペプチドの単純モデルとして用いた) の 2 倍希釈列水溶液 (1.56-400 μ g/ml) を 50 μ l ずつウェルに加えて固定化を行った。上清を捨てて TBS で 3 回洗浄した後、5% BSA (ウシ血清アルブミン) /TBS (0.15M NaCl を含むトリス-塩酸緩衝液) で 1 時間ブロックした。上清を捨てた後、ガラクトースを特異的に認識し得る標識化レクチンである HRP (ホース・ラディッシュ・パーオキシダーゼ) - 標識化 RCA (ヒマ種子レクチン) を 100 μ l ずつ加えて静置した。さらに、上清を捨てて TBS で洗浄し、HRP に対する基質である O-フェニレンジアミンを用いて発色させ 490 nm の吸光度を測定した。

【0026】上記と同様の実験を MMA C の代わりに B S 3 (ピス・スルホサクレンイミジル・スペレート) を 0.1 mg/m1 の濃度になるように 5 mM リン酸緩衝液 (pH5.0) に溶かして 100 μ l ずつウェルに加え、室温で 2 時間静置した後に上清を捨ててプレートをコートしたものを用い、比較した。その結果を図 1 に示した。図 1 にみられるようにリガンドの濃度が 5 μ g/m1 以下の濃度では B S 3 と MMA C では殆ど差が見られないが、5 μ g/m1 以上では MMA C のほうがはるかに効率よく、濃度依存的に固定化されていることが分かった。

【0027】実施例2

糖を固定化する際の時間を 1, 3, 6, 18 時間と変化させて、MMA C を用いて実施例 1 と同様の実験を行い、固定化時間の影響を調べた。その結果を図 2 に示した。図 2 に示すとおり、全ての固定化時間において濃度依存的な結果が得られたが、6 時間程度でほぼ平衡に達した。

【0028】実施例3

HRP - 標識化レクチンの反応時間を 15 分、30 分、1 時間、2 時間と変化させて MMA C を用いて実施例 1 と同様の実験を行った。その結果を図 3 に示した。反応収率は 1 時間で平衡に達した。

【0029】実施例4

実施例 1 と同様にして MMA C をコートしたマイクロタイタープレートに p-アミノフェニルガラクトピラノシドの 2 倍希釈列溶液 (1.56-400 μ l/ml) を加えて固定化

した。5% BSA /TBS でブロックした後に、RCA を 50 μ l ずつ加えて室温で 1 時間静置した。さらに洗浄とブロッキングを行い、4% ヒト A 型赤血球を 100 μ l 加え、1 時間静置して赤血球を溶血させた。検出はマイクロリーダーで 415 nm の吸光度を測定した。比較として MMA C コートを行わないプレートに対して同様の実験を行った。その結果を図 4 に示した。MMA C を介してアミノ化糖を固定化したものが MMA C を介さず固定化したものと比較し、その後のレクチン、赤血球による検出が容易に行えることが明らかになった。

【0030】実施例5

実施例 1 と同様にして MMA C をコートしたマイクロタイタープレートに p-アミノフェニルガラクトヒドラシドを固定化した。その際、固定化する糖の濃度を 6.25-400 μ g/m1 に変え、5% BSA /TBS でブロックした後に RCA 0.5 mg/m1 を 100 μ l ずつ加えて室温で 1 時間静置した。さらに、洗浄とブロッキングを行い、植物型 N-結合糖鎖に対する抗体 (抗 B-SJA-II 抗体、1000 倍希釈) を 100 μ l ずつ加えて室温で 1 時間反応させた。洗浄とブロッキングを行い、2 次抗体として HRP - 標識化抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) を 100 μ l 加えて室温で 30 分間静置した。発色は O-フェニレンジアミンを用いた方法で行い、490 nm の吸光度を測定した。その結果を図 5 に示した。その結果、アミノ化糖が、糖に対する抗体およびその二次抗体により感度良く検出できることが明らかになった。

【0031】実施例6

ヒマ種子レクチン (RCA) 1 mg を 0.1 mM CaCl₂ - 30 mM NaCl - 50 mM Tris - HCl (pH7.8) 500 μ l に溶かして 100 °C、10 分間加熱し、同じ緩衝液に溶かしたトリプシン (20 μ g/2 μ l) を加えて 37 °C で 24 時間静置して、タンパク質を消化した。さらに、0.2 M PMSF と 0.2 M EDTA を 5 μ l 加えて 100 °C で 10 分間加熱し、反応を停止させた。タンパク質を加えないで同様の操作をしたものとプランクとした。この消化物の一部を C18 逆相 HPLC カラムに加え、ペプチドを分離した。分離は C18 逆相系のカラム (4 × 150 mm) を用い、流速 1.0 ml/min、温度 40 °C、検出は 220 nm で行い、0.05% トリフルオロ酢酸から 60% 2-プロパノール : アセトニトリル (7:3) への 60 分間直線グラジェントにて行った。得られたクロマトグラムを図 6 に示した。

【0032】ヘキサンに溶かした MMA C (1mg/ml) をタイタープレートのウェルに 100 μ l ずつ加えて室温で 30 分間静置した。分取したペプチドフラクションは Speed Vac で乾燥させ、純水を加えてその一部を 50 mM トリス-マレイン酸緩衝液に溶かして 50 μ l とし、上清を捨てたウェルに加えた。18 時間、4 °C で静

置してペプチドを固定化した。またMMA Cの変わりにBS 3を用いて同様な固定化をおこなった。BS 3を0.1mg/m1の濃度になるように5mMリン酸緩衝液(pH5.0)に溶かし、タイタープレートのウェルに50μlずつ加えて、37℃で2時間コートした。さらに、分取したペプチドフラクションの一部をPBSに溶かして50μlとし、ウェルに加えてBS 3とともにインキュベートした。18時間、4℃で静置してペプチドの固定化を行った。

【0033】ペプチドを固定化したプレートのウェルをTBSで3回洗浄し、5%BSA/TBSで1時間、室温でブロッキングを行った。上清を捨てて、HRP-標識化(コンカナバリンA)Con Aの1000倍希釈溶液を100μl加え、室温で1時間反応させた。洗浄後、ウェル中の糖を含むペプチドと結合したHRP-標識化Con AをO-フェニレンジアミンを用いた方法で発色を行い、490nmの吸光度を測定して検出した。その結果を図6に示した。陽性と検出されたものが図6にて番号を記したピーク(29, 31, 44, 47, 47, 48, 51, 54, 58, 59, 60, 65, 67)である。

【0034】また、これらのフラクションについてMMA Cコート法とBS 3法とを比較した結果を図7に示した。その結果、全体的にMMA Cで固定化したほうが吸光度が高く、BS 3では、ほとんど検出されていないフラクション(ピーク29, 44, 48, 51, 67)もMMA Cでは検出することができた。特に、フラクション中に糖鎖のついていないペプチドが混在していて糖ペプチドの量が少ない場合(ピーク44, 54)MMA CとBS 3の固定化量の差がみられた。また、タイタープレートの表面をコートしない場合はペプチドは全く検出されなかった。

【0035】実施例7

実施例1と同様にしてMMA Cをコートしたマイクロタイタープレートにヒト乳オリゴ糖を一定量加え、5%BSA/TBSでブロックした。25μg/m1のモノクローナル抗体(NS10C17)液(0.15M NaCl, 10%BSA, 0.1%NaN₃を含むTBS)を加え、室温で30分間反応させた。反応後、TBSで3回洗浄し、2次抗体としてHRP-標識化抗マウスIgM抗体溶液を加え、室温で30分間静置した。発色はO-フェニレンジアミンを用いた方法で行い、490nmの吸光度を測定した。その結果、LNDI(L^b構造[Fucα1→2Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNAc])を含むラクト-N-ジフコペントオースI[Fucα1→2Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc]が感度良く検出できた。

【0036】参考例1

実施例6におけるRCAのトリプシン消化物の一部を0.1M Ac0Na-1mM CaCl₂-1mM MgCl₂-150mM NaCl緩衝液で平衡化したCon Aアガロースカラム(3ml)にかけ、緩衝液20m

lで洗浄後、0.1Mメチルα-マンノシド溶液10mlで溶出した。この糖ペプチド画分を濃縮した後、C18逆相HPLCカラムにかけたクロマトグラムを図8に示した。実施例6におけるペプチドと同様にMMA C法にて検出した結果、陽性だった7つのピークに番号を付与した。

【0037】参考例2

参考例1における7つのピークフラクション、および実施例6で得られた12のピークフラクションについてアミノ酸配列分析を行ったところ、表1のような結果となった。(グリコシレーションサイトを下線部で、分析された配列を実線で、既知の報告から分かる配列を袋文字で示した。)

表1において、左縦軸のピーク番号は、RCA消化物の逆相クロマトグラフィーによって得られた陽性ピークフラクション番号を示し、右縦軸は、RCA消化物のCon Aアガロースカラムによるアフィニティクロマトグラフィーによって得られた陽性ピークフラクション番号を示している。

【0038】表1において、ピーク1, 2, 4はRCAのB-85のハイマンノース型糖鎖がついているペプチド、ピーク3, 5, 6, 7はRCAのB-135のハイマンノース型糖鎖がついているペプチドであった。A-10とB-73に結合しているコンプレックス型糖鎖は、Con Aアガロースカラムでは得られなかった。一方、MMA Cコート法によればピーク31, 44, 51, 66, 67は、それぞれ、B-85、A-10、B-135、A-10、A-10に相当し、Con Aアガロース法では検出できない糖ペプチドを検出することができた。従って、MMA C固定化方法による糖鎖の検出により、Con Aアガロースカラムでは得られなかった糖ペプチドが検出できることが明らかとなった。なお、アミノ酸配列分析はApplied BiosystemsのProtein sequencer Model 476Aにて分析した。

【0039】

【発明の効果】本発明の方法によれば、糖鎖を固相に共有的に結合することによって、レクチン、抗体、糖分解酵素などの糖認識能を有する物質との相互作用の解析を行うことにより、簡便に且つ効率よく糖鎖構造を決定することができる。さらに、従来法である固定化レクチンを用いたクロマトグラフィーによって分析する方法では検出されなかった糖鎖も、本発明方法によれば検出することが可能である。また、微量多種の試料について一度にそれらの糖鎖構造を決定することができる。本発明の方法は、癌診断薬などの開発など糖鎖の関与が予想される方面での応用が期待される。

【0040】本発明の糖鎖構造を決定する方法、すなわち、(1)複合糖質由来の糖鎖または糖ペプチドと、該糖鎖または該糖ペプチドの分子末端基と反応して共有結合を形成し得る反応基を有するポリマーでコーティング

した固相とを反応させて固定化糖鎖または固定化糖ペプチドを生成し、(2-1) 該固定化糖鎖または固定化糖ペプチドと、これらと特異的に結合する標識化された物質とを反応させ、または(2-2) 該固定化糖鎖または固定化糖ペプチドと、これらと特異的に結合する結合用物質とを反応させ、さらに、得られる生成物と、該結合用物質と特異的に結合する標識物質とを反応させ、次いで、(3) 生成する標識化された固相を検出することを特徴とする糖鎖構造を決定する方法の好ましい態様をまとめると以下のとおりである。

【0041】(i) 上記(1)において、固相に固定化すべき糖鎖および糖ペプチドは複合糖質を酵素により消化して調製する。

(ii) 上記(1)において、共有結合を形成し得る反応基がエポキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、ヒドラジノ基、カルボキシル基、酸無水物基またはホルミル基である。

(iii) 上記(1)において、反応基を有するポリマーの分子量が400~100万である。

【0042】(iv) 上記(2-1)において、標識化された物質が標識レクチンである。

(v) 上記(2-1)において、標識化された物質が標識抗体である。

(vi) 上記(2-2)において、結合用物質が標識化されていないレクチンまたは抗体であり、また、該結合用物質と特異的に結合する標識物質が標識化抗体、赤血球またはポリマーラテックスである。

【図面の簡単な説明】

【図1】p-アミノフェニルグリコシドのプレートへの固定化におけるコーティング用ポリマーおよび同グリコシド濃度のRCA固定化量(吸光度としても表示)に及ぼす影響を示す。

【図2】p-アミノフェニルグリコシドの固定化における固定化時間および同グリコシド濃度のRCA固定化量(吸光度としても表示)に及ぼす影響を示す。

【図3】固定化p-アミノフェニルグリコシドに対するHRP-レクチン(RCA)の反応時間および同グリコシド濃度のRCA固定化量(吸光度としても表示)に及ぼす影響を示す。

【図4】p-アミノフェニルグリコシドに結合したレクチン(RCA)の赤血球による検出において、MMA Cコートの有無および同グリコシド濃度のRCA固定化量(吸光度としても表示)に及ぼす影響を示す。

【図5】抗体を用いたp-アミノフェニルグリコシドの検出において、同グリコシド濃度のRCA固定化量(吸光度としても表示)に及ぼす影響を示す。

【図6】RCAのトリプシン消化物の逆相高速液体クロマトグラフィーによる分析結果を示す。

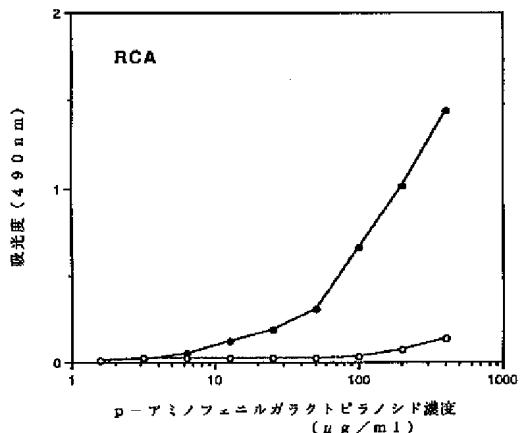
【図7】RCA由来のペプチドフラクションを、MMA CコートとBS3コートに固定化した結果を比較して示す。

【図8】RCAの消化物の、Con Aアガロースカラムによるアフィニティクロマトグラフィーによる分析結果を示す。

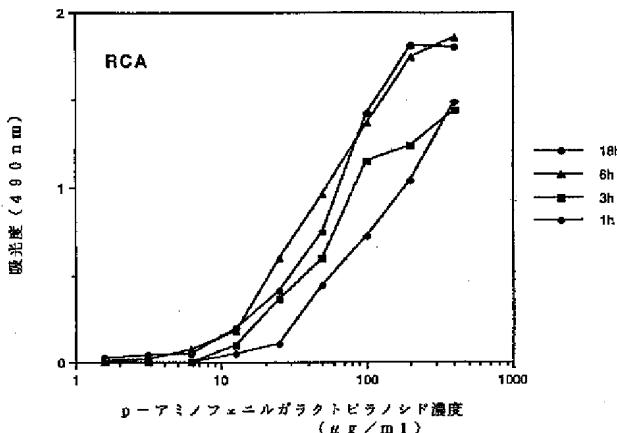
【表1】

ピークNo.	保持時間	アミノ酸配列	糖鎖構造	RCA糖鎖 結合位置(グリコペプチド)
29	19.430	<u>QIWDNRT</u>	高マンノース型	B-85 1
31	20.043	<u>IWDNRT</u>	高マンノース型	B-85
44	23.423	<u>QYPINFT</u>	複合型	A-10
47	24.510	<u>WQIWDNRT</u>	高マンノース型	B-85 2
48	24.976	<u>AVSQGWLPTNNNT</u>	高マンノース型	B-135 3
51	26.016	<u>LTQTNIYAVSQGWLPTNNNT</u>	高マンノース型	B-135
54	26.883	<u>WQIWDNRT</u>	高マンノース型	B-85 4
58	28.743	<u>AVSQGWLPTNNNT</u>	高マンノース型	B-135 5
59	29.030	<u>AVSQGWLPTNNNT</u>	高マンノース型	B-135 6
60	29.403	<u>AVSQGWLPTNNNT</u>	高マンノース型	B-135 7
65	31.463	<u>QYPINFT</u>	複合型	A-10
67	32.103	<u>QYPINFT</u>	複合型	A-10

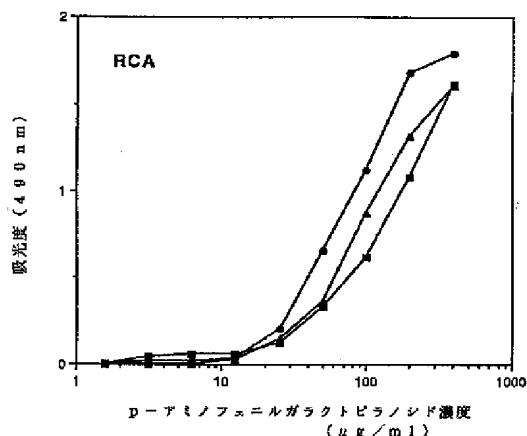
【図1】



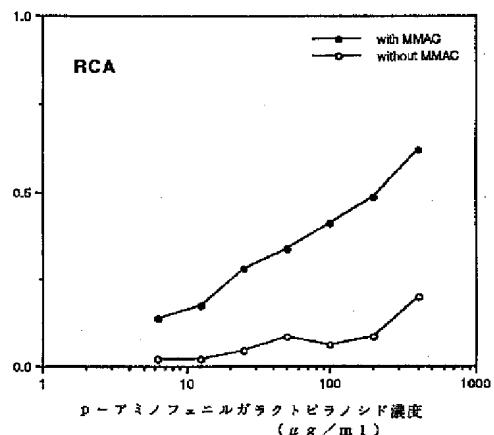
【図2】



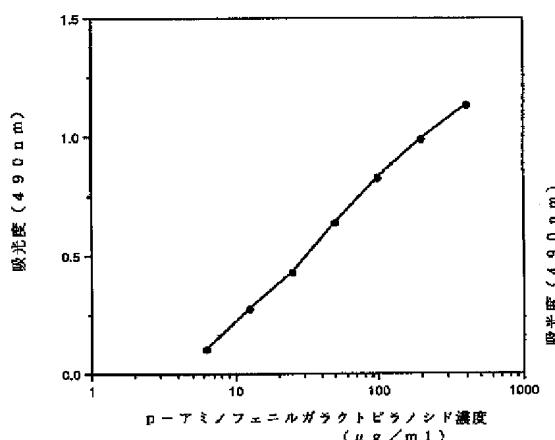
【図3】



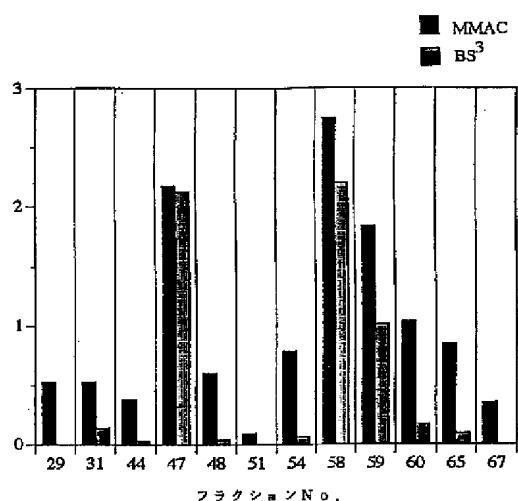
【図4】



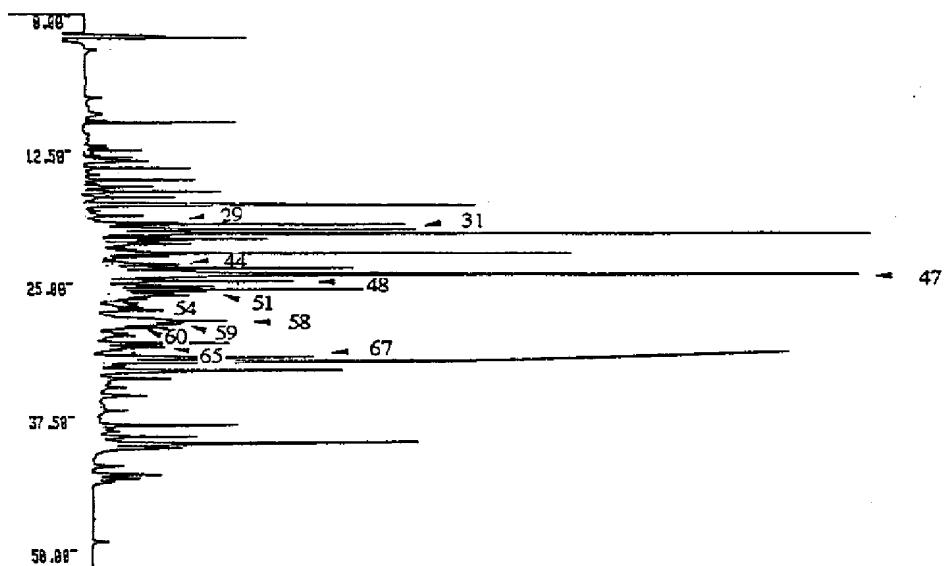
【図5】



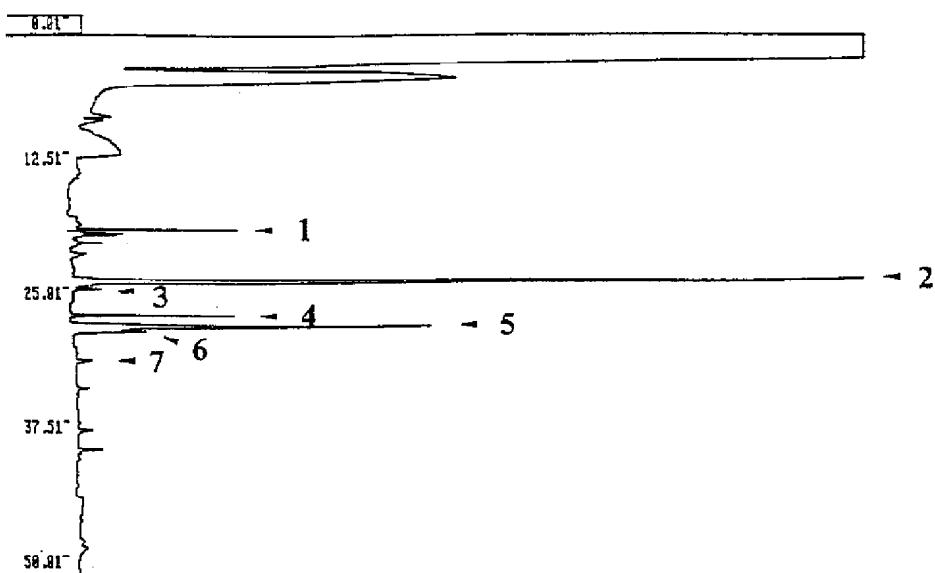
【図7】



【図6】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 小川 溫子
東京都目黒区中目黒二丁目2番30号111

(72)発明者 松本 眞武
千葉県浦安市美浜四丁目3番13号

(72)発明者 中山 珠美
神奈川県川崎市川崎区扇町5-1 昭和電

工株式会社化学品研究所内

(72)発明者 森口 征矢夫
東京都港区芝大門一丁目13番9号 昭和電
工株式会社内